

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Art Unit : 1621
Examiner : Deborah D. Carr
Serial No. : 10/799,532
Filed : March 12, 2004
Inventor : Pierre Potier
Title : METHOD FOR THE PREPARATION OF
: UNSATURATED HYDROXY FATTY
: ACIDS AND THEIR ESTERS, THEIR
: USE IN PHARMACEUTICAL AND/OR
: COSMETIC PREPARATIONS

Customer No.: 035811

Docket No.: 1054-04

Confirmation No.: 8499

Dated: June 6, 2005

CLAIM FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. §119

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

We submit herewith the certified copy of French Patent Application No. 0111815, filed September 12, 2001, the priority of which is hereby claimed.

Respectfully submitted,

T. Daniel Christenbury
Reg. No. 31,750
Attorney for Applicants

TDC:cc
(215) 656-3381

THIS PAGE BLANK (USPTO)



BEST AVAILABLE COPY

532

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 17 MAI 2005

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

THIS PAGE BLANK (USPTO)



26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION**CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*01

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

Important

Remplir impérativement la 2ème page.

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 190600

Réservé à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE **12 SEPT 2001**LIEU **75 INPI PARIS B**N° D'ENREGISTREMENT
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI**0111815**DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE
PAR L'INPI**2 SEP. 2001****Vos références pour ce dossier**
(facultatif) 13050FR**1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE**
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉEBREESE-MAJEROWICZ
3 avenue de l'Opéra
75001 PARIS**Confirmation d'un dépôt par télécopie**☐ N° attribué par l'INPI à la télécopie**2 NATURE DE LA DEMANDE****Cochez l'une des 4 cases suivantes**

Demande de brevet



Demande de certificat d'utilité



Demande divisionnaire

*Demande de brevet initiale*

N°

Date ____/____/____

ou demande de certificat d'utilité initiale

N°

Date ____/____/____

Transformation d'une demande de
brevet européen *Demande de brevet initiale*

N°

Date ____/____/____

3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)PROCÉDÉ DE PRÉPARATION DES HYDROXY-ACIDES GRAS INSATURÉS ET DE LEURS ESTERS, LEUR
UTILISATION COMME AGENT ANTI-COLLAGÉNASE**4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ
OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE
LA DATE DE DÉPÔT D'UNE
DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE**

Pays ou organisation

Date ____/____/____

N°

Pays ou organisation

Date ____/____/____

N°

Pays ou organisation

Date ____/____/____

N°

☐ S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»**5 DEMANDEUR**☒ S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

Nom ou dénomination sociale

DIVERCHIM

Prénoms

Forme juridique

S.A.

N° SIREN

Code APE-NAF

Adresse

Rue

Les Marches de l'Oise

100 rue Louis Blanc

Code postal et ville

60765

MONTATAIRE Cedex

Pays

France

Nationalité

Française

N° de téléphone (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)



BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

| | | | | | |
|--|--|----------------------|---|-------------------|--|
| REMISE DES PIÈCES DATE 12 SEPT 2001 LIEU 75 INPI PARIS B N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI 0111815 | | Réservé à l'INPI | | DB 540 W / 190600 | |
| Vos références pour ce dossier : <i>(facultatif)</i> | | | 13050FR | | |
| 6 MANDATAIRE | | | | | |
| Nom | | | BREESE | | |
| Prénom | | | Pierre | | |
| Cabinet ou Société | | | BREESE-MAJEROWICZ | | |
| N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel | | | | | |
| Adresse | | Rue | 3 avenue de l'Opéra | | |
| | | Code postal et ville | 75001 | Paris | |
| N° de téléphone <i>(facultatif)</i> | | | 01 47 03 67 77 | | |
| N° de télécopie <i>(facultatif)</i> | | | 01 47 03 67 78 | | |
| Adresse électronique <i>(facultatif)</i> | | | office@breese.fr | | |
| 7 INVENTEUR (S) | | | | | |
| Les inventeurs sont les demandeurs | | | <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée | | |
| 8 RAPPORT DE RECHERCHE | | | Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation) | | |
| Établissement immédiat ou établissement différé | | | <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> | | |
| Paiement échelonné de la redevance | | | Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non | | |
| 9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES | | | Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (<i>joindre un avis de non-imposition</i>) <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt (<i>joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence</i>): | | |
| Si vous avez utilisé l'imprimé «Sulte», indiquez le nombre de pages jointes | | | 1 | | |
| 10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) BREESE Pierre 921038 | | | VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI | | |

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Page suite N° 1... / 1...

Réservé à l'INPI

REMISE DES PIÈCES
DATE **12 SEPT 2001**
LIEU **75 INPI PARIS B**

N° D'ENREGISTREMENT **0111815**
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

09 829 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)

13050FR

**4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ
OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE
LA DATE DE DÉPÔT D'UNE
DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE**

Pays ou organisation

Date / / N°

Pays ou organisation

Date / / N°

Pays ou organisation

Date / / N°

5 DEMANDEUR

Nom ou dénomination sociale

POTIER

Prénoms

Pierre

Forme juridique

N° SIREN

Code APE-NAF

Adresse

Rue

14 avenue de Breteuil

Code postal et ville

75007

PARIS

Pays

France

Nationalité

Française

N° de téléphone (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

5 DEMANDEUR

Nom ou dénomination sociale

Prénoms

Forme juridique

N° SIREN

Code APE-NAF

Adresse

Rue

Code postal et ville

Pays

Nationalité

N° de téléphone (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

**10 SIGNATURE DU DEMANDEUR
OU DU MANDATAIRE
(Nom et qualité du signataire)**

BRESE Pierre

921038

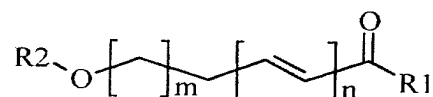
VISA DE LA PRÉFECTURE
OU DE L'INPI

PROCEDE DE PREPARATION DES HYDROXY-ACIDES GRAS INSATURES ET
DE LEURS ESTERS, LEUR UTILISATION COMME AGENT ANTI-
COLLAGENASE

La présente invention se rapporte au domaine des procédés chimiques et à l'utilisation des produits obtenus par ces procédés chimiques.

La présente invention se rapporte plus particulièrement à un procédé de préparation des hydroxy-acides gras insaturés et de leurs esters répondant à la formule générale suivante (Id) :

Formule (Id)



avec $n = 1$ à 4

$m = 2$ à 16

$\text{R}_1 = \text{OH}, \text{Cl}, \text{Br}, \text{OR}_3$ où R_3 représente un radical alkyl, alkényl, alkynyl, linéaire ou ramifié de 1 à 16 carbones ou esters du glycérol, éventuellement substitué par un ou plusieurs atomes de carbone, d'azote, de soufre ou d'halogènes tels que fluor, chlore, brome et iode,

$\text{R}_2 = \text{H}, \text{SiR}'_1\text{R}'_2\text{R}'_3$ où $\text{R}'_1, \text{R}'_2, \text{R}'_3$ identiques ou différents les uns des autres, représentent un radical alkyl, alkényl, alkynyl, linéaire ou ramifié de 1 à 16 carbones ou esters du glycérol, éventuellement substitué par un ou plusieurs atomes de carbone, d'azote, de soufre ou d'halogènes tels que fluor, chlore, brome et iode,

ou $\text{R}_2 = \text{C}-\text{Ar}$, avec Ar représentant un radical aryl éventuellement substitué par un ou plusieurs atomes de carbone, d'azote, de soufre ou d'halogènes tels que fluor, chlore, brome et iode,

ou R_2 = le tétrahydropyranyl de formule :



et à l'utilisation desdits produits comme agent anti-collagénase.

5

Les produits répondant à la formule générale (Id) sont connus et décrits dans la littérature pour leurs propriétés biologiques et plus particulièrement pour leurs propriétés cosmétiques et pharmacologiques. D'ailleurs, le principal constituant lipidique de la gelée royale des abeilles qui est l'acide hydroxy-10-décène-2-oïque (ou DHA) répond à la formule générale (Id) dans laquelle $R_1 = OH$, $R_2 = H$, $n = 1$ et $m = 3$.

15

Différents documents de l'état de la technique rapportent des procédés de préparation des hydroxy-acides gras insaturés et de leurs esters (Lee et al., 1993, J. Org. Chem., vol. 58, pages 2918-2919 ; Hurd et Saunders, 1952, J. Am. Chem. Soc., vol. 74, pages 5324-5328 ; Krishnamurthy et al., 1989, Indian J. Chem. Sect. A, vol. 28, pages 288-291 ; Plettner et al., 1995, J. Chem. Ecol., vol. 21, pages 1017-1030). Les procédés déjà connus dans l'état de la technique présentent une étape d'oxydation durant laquelle des sels métalliques comme les sels de chrome ou de manganèse sont employés. Or, l'utilisation de sels métalliques présente un certain nombre d'inconvénients. D'une part, au niveau des produits obtenus par lesdits procédés, ces derniers peuvent être contaminés par les sels métalliques et donc leur application cosmétique et/ou pharmacologique est limitée du fait de cette contamination. D'autre part, l'utilisation de sels métalliques entraîne une contamination de l'environnement des industries dans lesquelles la synthèse est effectuée.

25

20

30

ou R_2 = le tétrahydropyranyl de formule :



et à l'utilisation desdits produits comme agent anti-collagénase.

5

Les produits répondant à la formule générale (Id) sont connus et décrits dans la littérature pour leurs propriétés biologiques et plus particulièrement pour leurs propriétés cosmétiques et pharmacologiques. D'ailleurs, le principal constituant lipidique de la gelée royale des abeilles qui est l'acide hydroxy-10-décène-2(trans)oïque (ou DHA) répond à la formule générale (Id) dans laquelle $R_1 = OH$, $R_2 = H$, $n = 1$ et $m = 3$.

10

15

20

25

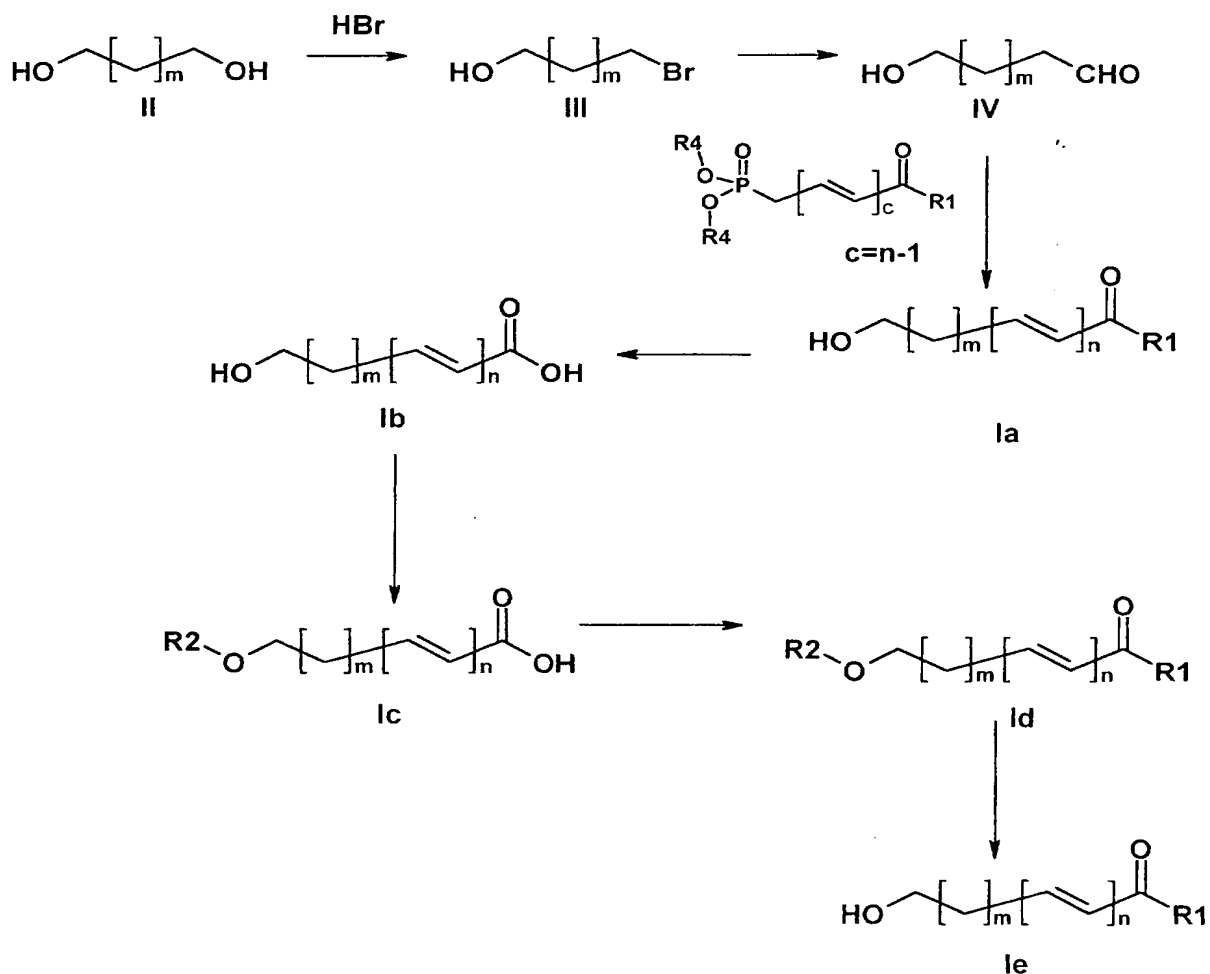
30

Différents documents de l'état de la technique rapportent des procédés de préparation des hydroxy-acides gras insaturés et de leurs esters (Lee et al., 1993, J. Org. Chem., vol. 58, pages 2918-2919 ; Hurd et Saunders, 1952, J. Am. Chem. Soc., vol. 74, pages 5324-5328 ; Krishnamurthy et al., 1989, Indian J. Chem. Sect. A, vol. 28, pages 288-291 ; Plettner et al., 1995, J. Chem. Ecol., vol. 21, pages 1017-1030). Les procédés déjà connus dans l'état de la technique présentent une étape d'oxydation durant laquelle des sels métalliques comme les sels de chrome ou de manganèse sont employés. Or, l'utilisation de sels métalliques présente un certain nombre d'inconvénients. D'une part, au niveau des produits obtenus par lesdits procédés, ces derniers peuvent être contaminés par les sels métalliques et donc leur application cosmétique et/ou pharmacologique est limitée du fait de cette contamination. D'autre part, l'utilisation de sels métalliques entraîne une contamination de l'environnement des industries dans lesquelles la synthèse est effectuée.

Le procédé de préparation vise donc à résoudre les problèmes cités ci-dessus en proposant une nouvelle voie de synthèse originale permettant une transposition industrielle.

5 De plus, le procédé de l'invention est remarquable en ce qu'il permet d'obtenir une méthode de synthèse plus rapide avec de meilleurs rendements que les procédés déjà connus de l'art antérieur. En effet, le
10 procédé de l'invention permet d'éviter, dans les premières étapes dudit procédé, les chromatographies qui ne sont pas des techniques industrielles de purification.

Le schéma général de synthèse est le suivant



où R_1 , R_2 , m et n ont la même signification que dans la formule (Id).

La première étape de cette synthèse est une bromation, le composé de départ de la réaction est un diol de formule (II). De nombreuses techniques permettant une bromation sont connues dans l'état de la technique et sont utilisables par l'homme du métier à cette étape. Cette bromation nécessite l'utilisation d'un solvant qui peut notamment être le toluène, le benzène, le diméthylformamide, le tétrahydrofuran, le cyclohexane, l'heptane, l'éther de pétrole, etc... Le réactif utilisé dans cette étape de bromation peut être le HBr aqueux ou non, le $\text{Ph}_3\text{P}, \text{Br}_2$, le tétrabromide de carbone triphénylphosphine, l'acide hydrobromique. A titre d'exemple, on peut citer les conditions expérimentales de bromation utilisant du HBr aqueux décrites dans Geresh et al., Tetrahedron Asymmetry, 1998, vol. 9, pages 89-96.

La seconde étape est une oxydation en aldéhyde de formule (IV) en présence d'un N-oxyde d'amine tertiaire cyclique ou non cyclique, anhydre ou non anhydre en présence de DMSO. En fin de réaction, le bromhydrate de l'amine tertiaire correspondante est éliminé par simple filtration. De façon avantageuse, les N-oxydes d'amine tertiaire cycliques ou non cycliques, anhydres ou non anhydres présents à la seconde étape sont choisis parmi le N méthyl morpholine oxyde, le triméthylamine oxyde ou le triéthylamine oxyde ou mélange de ceux-ci. L'art antérieur connaît d'autres techniques permettant de synthétiser les aldéhydes de formule générale IV. Cependant, l'étape 2 du procédé de l'invention permet de résoudre les inconvénients des techniques déjà connues dans l'état de la technique. A titre d'exemple, on peut citer la réaction d'oxydation en présence de sels de manganèse des alcènes cycliques

correspondant (Lee et al., 1993, J. Org. Chem., vol. 10, pages 2918-2919). L'étape 2 du procédé objet de l'invention permet donc d'éviter une étape en présence de sels métalliques. L'article de Guindon et al., de 1984 (J. Org. Chem., vol. 49, pages 3912-3920) décrit la synthèse de 8-hydroxy-octanal à partir de 1,1-diméthoxy-8-méthoxyméthoxy-octane. Cependant le rendement de synthèse de 8-hydroxy-octanal est relativement faible (36%) alors que l'étape 2 de l'invention permet d'obtenir des rendements plus élevés. Les autres techniques connues dans l'art antérieur permettant de synthétiser les aldéhydes de formule générale IV sont des méthodes de synthèse longues présentant plus de 4 étapes.

L'étape 3 du procédé de l'invention est une réaction de Witting-Horner. Cette réaction est une réaction connue de l'homme du métier (Modern Synthetic Reaction, Second edition, Herbet O. House, wittig horner reaction pages 682 à 709) et toute condition expérimentale décrite dans l'état de la technique peut être utilisée dans le cadre de la présente invention. A titre d'exemple, la réaction de Witting-Horner peut être réalisée en présence de triéthylphosphonoacétate et de carbonate de potassium.

L'étape 4 du procédé de l'invention est une étape de saponification. Aucune condition expérimentale particulière n'est mise en œuvre dans le procédé de l'invention. L'homme du métier sera à même de trouver les conditions expérimentales adéquates à utiliser pour cette étape.

L'étape 5 du procédé est une étape de protection spécifique de la fonction alcool du composé de formule générale Ib obtenu à l'étape 4. Cette réaction s'effectue dans tout éther d'énol en présence d'un

catalyseur acide. De façon avantageuse, la réaction s'effectue dans le dihydropyrane en présence d'APTS (Acide para toluène sulfonique). Le produit de formule générale Ic obtenu après l'étape 5 est purifié par simple lavage aqueux et séchage sur sulfate. L'étape 2 et l'étape 5 du procédé de l'invention sont non décrites dans l'état de la technique. Elles permettent de résoudre les problèmes techniques décrits ci-dessus tout en augmentant le rendement et la rapidité du procédé de synthèse des composés de formule générale I.

Le produit de formule (Id) obtenu à l'étape 5 du procédé de l'invention peut subir une déprotection finale afin d'obtenir le composé de formule générale (Ie). Cette déprotection est réalisée dans une solution de méthanol contenant un catalyseur acide. Tout catalyseur acide peut être utilisé dans l'invention. De façon avantageuse, le catalyseur acide utilisé est l'ATPS.

Le produit de formule (Id) obtenu à l'étape 5 du procédé de l'invention peut être utilisé dans une réaction d'estérification du glycérol. Suivant les quantités relatives de glycérol utilisées, peuvent être obtenus des monoesters (2 isomères possibles : en position 1 et 2), des diesters (2 isomères possibles : diesters 1,1 et 1,2) et des triesters. Après l'étape d'estérification du glycérol, le composé obtenu peut subir une déprotection finale dans des conditions expérimentales identiques aux conditions de déprotection du produit de formule (Id) citées ci-dessus.

Les produits obtenus par le procédé objet de l'invention en instance sont, comme indiqué précédemment, utilisés dans le domaine cosmétologique et/ou pharmaceutique. Cependant, les travaux de la Demanderesse ont permis de mettre en évidence que les produits obtenus

par le procédé de l'invention suivi d'une étape de déprotection finale présentent une activité anti-collagénase.

5 Le collagène est la protéine la plus abondante et la plus importante du corps humain et de la peau. Cette scléroprotéine représente notamment 75% des protéines du derme auquel elle assure solidité. Le fibroblaste fabrique à partir des acides aminés (hydroxyproline, Iysine, 10 proline) des molécules de procollagène qui se transforment en présence de vitamine C en molécules de collagène. Pour former un réseau de fibrilles, le collagène doit créer des liaisons entre ces différentes molécules.

15 Le renouvellement du collagène change avec l'âge. Le collagène soluble qui donne souplesse et résistance à la peau et aux muqueuses se dégrade de plus en plus rapidement sous l'influence d'une enzyme protéolytique qu'est la collagénase, ce qui entraîne, au niveau du derme, un vieillissement de la structure fibreuse des protéines. 20 En outre, le collagène insoluble qui entraîne une perte d'élasticité se rigidifie en se polymérisant avec des molécules de glucose grâce à des liaisons multiples difficilement réversibles (phénomène de glycation). Ces liaisons rendent le collagène plus résistant à l'attaque 25 par les collagénases ce qui entraîne une rigidité croissante des fibres de collagène. Ce phénomène de durcissement, caractéristique des tissus cutanés âgés, doit être combattu le plus tôt possible car il augmente la destruction des fibroblastes par les radicaux libres mais 30 aussi la dénaturation des protéines du derme.

35 Les collagénases sont des enzymes faiblement exprimées dans les conditions physiologiques normales. Leur surexpression lors du vieillissement et en particulier lors de la ménopause chez la femme entraîne une dénaturation plus importante des protéines fibreuses du derme.

Cependant, la destruction des fibres de collagène peut survenir lors d'autres circonstances que le vieillissement. En effet, lors d'une infection bactérienne, les collagénases bactériennes peuvent détruire les fibres de collagène de l'hôte infecté.

De plus, l'invasion tumorale nécessite une dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire et de toutes les protéines de structure de ces composants parmi lesquelles se trouve le collagène. Ainsi, il a été montré une très nette relation entre le pouvoir invasif des tumeurs et la présence d'activité collagénase dans les tumeurs humaines. On retrouve les collagénases au niveau des cellules tumorales, mais aussi dans les fibroblastes entourant la tumeur. Les cellules épithéliales normales sécrètent un taux très faible de collagénases, alors que ces protéines sont surexprimées par les cellules tumorales invasives ou métastatiques.

D'autres maladies dégénératives présentent une dégénérescence fibrinoïde du collagène et sont également appelées « maladies du collagène ».

L'invention concerne donc l'utilisation des produits susceptibles d'être obtenus par le procédé de l'invention comme agent actif anti-collagénase. Les travaux de la Demanderesse ont plus particulièrement permis de mettre en évidence l'activité anti-collagénase de l'acide 10-hydroxy-trans décénoïque (DHA) et du glycérol ester de l'acide 10-hydroxy-trans décénoïque (monoester du glycérol en position 1). L'invention concerne également l'utilisation de l'acide 10-hydroxy-trans décénoïque (DHA) ou du glycérol ester de l'acide 10-hydroxy-trans décénoïque comme agent actif anti-collagénase dans une préparation médicamenteuse et/ou cosmétique.

Cependant, la destruction des fibres de collagène peut survenir lors d'autres circonstances que le vieillissement. En effet, lors d'une infection bactérienne, les collagénases bactériennes peuvent détruire les fibres de collagène de l'hôte infecté.

De plus, l'invasion tumorale nécessite une dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire et de toutes les protéines de structure de ces composants parmi lesquelles se trouve le collagène. Ainsi, il a été montré une très nette relation entre le pouvoir invasif des tumeurs et la présence d'activité collagénase dans les tumeurs humaines. On retrouve les collagénases au niveau des cellules tumorales, mais aussi dans les fibroblastes entourant la tumeur. Les cellules épithéliales normales sécrètent un taux très faible de collagénases, alors que ces protéines sont surexprimées par les cellules tumorales invasives ou métastatiques.

D'autres maladies dégénératives présentent une dégénérescence fibrinoïde du collagène et sont également appelées « maladies du collagène ».

L'invention concerne donc l'utilisation des produits susceptibles d'être obtenus par le procédé de l'invention comme agent actif anti-collagénase. Les travaux de la Demanderesse ont plus particulièrement permis de mettre en évidence l'activité anti-collagénase de l'acide hydroxy-10-décène-2(trans)oïque (DHA) et du glycérol ester de l'acide hydroxy-10-décène-2(trans)oïque (monoester du glycérol en position 1). L'invention concerne également l'utilisation de l'acide hydroxy-10-décène-2(trans)oïque (DHA) ou du glycérol ester de l'acide hydroxy-10-décène-2(trans)oïque comme agent actif anti-collagénase dans une préparation médicamenteuse et/ou cosmétique.



L'invention concerne l'utilisation de l'acide 10-hydroxy-trans décénoïque (DHA) et/ou du glycérol ester de l'acide 10-hydroxy-trans décénoïque pour la préparation d'un médicament destiné à prévenir ou à guérir la dégradation du collagène. Ce médicament est tout particulièrement destiné à prévenir ou à guérir la dégradation du collagène par les collagénases bactériennes lors d'une infection bactérienne.

L'invention concerne également l'utilisation de l'acide 10-hydroxy-trans décénoïque (DHA) et/ou du glycérol ester de l'acide 10-hydroxy-trans décénoïque pour la préparation d'un médicament destiné à la régénérescence de la peau et des ligaments.

L'invention concerne aussi l'utilisation de l'acide 10-hydroxy-trans décénoïque (DHA) et/ou du glycérol ester de l'acide 10-hydroxy-trans décénoïque pour la préparation d'un médicament destiné à prévenir ou à guérir l'invasion tumorale.

L'invention concerne aussi l'utilisation de l'acide 10-hydroxy-trans décénoïque (DHA) et/ou du glycérol ester de l'acide 10-hydroxy-trans décénoïque pour la préparation d'un médicament destiné à prévenir ou à guérir des maladies dégénératives présentant une dégénérescence fibrinoïde du collagène et également appelées « maladies du collagène ».

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront des exemples qui suivent concernant d'une part des procédés de synthèse de l'invention, et d'autre part, des propriétés anti-collagénase des produits susceptibles d'être obtenus des polymères par les procédés de synthèse de l'invention.

L'invention concerne l'utilisation de l'acide hydroxy-10-décène-2(trans)oïque (DHA) et/ou du glycérol ester de l'acide hydroxy-10-décène-2(trans)oïque pour la préparation d'un médicament destiné à prévenir ou à guérir la dégradation du collagène. Ce médicament est tout particulièrement destiné à prévenir ou à guérir la dégradation du collagène par les collagénases bactériennes lors d'une infection bactérienne.

L'invention concerne également l'utilisation de l'acide hydroxy-10-décène-2(trans)oïque (DHA) et/ou du glycérol ester de l'acide hydroxy-10-décène-2(trans)oïque pour la préparation d'un médicament destiné à la régénérescence de la peau et des ligaments.

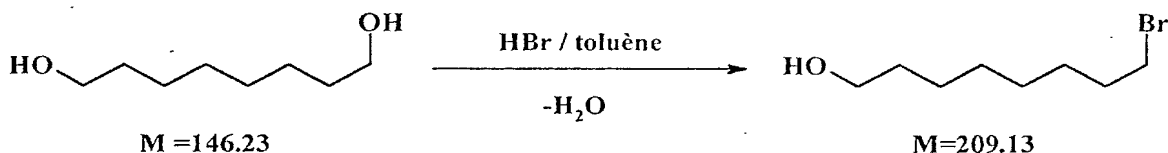
L'invention concerne aussi l'utilisation de l'acide hydroxy-10-décène-2(trans)oïque (DHA) et/ou du glycérol ester de l'acide hydroxy-10-décène-2(trans)oïque pour la préparation d'un médicament destiné à prévenir ou à guérir l'invasion tumorale.

L'invention concerne aussi l'utilisation de l'acide hydroxy-10-décène-2(trans)oïque (DHA) et/ou du glycérol ester de l'acide hydroxy-10-décène-2(trans)oïque pour la préparation d'un médicament destiné à prévenir ou à guérir des maladies dégénératives présentant une dégénérescence fibrinoïde du collagène et également appelées « maladies du collagène ».

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront des exemples qui suivent concernant d'une part des procédés de synthèse de l'invention, et d'autre part, des propriétés anti-collagénase des produits susceptibles d'être obtenus des polymères par les procédés de synthèse de l'invention.

Ia (n=1, m=6, R1=OEt) et Ie (triester de glycérol).

5 1. Etape 1 de Bromation.



438g (3mol) de 1,8-octanediol sont mis en solution dans 3l de toluène. 375ml (3.3mol) d'HBr aqueux 48% sont ensuite ajoutés. Le milieu est ensuite chauffé pour éliminer l'eau présente et l'eau formée lors de la réaction par distillation azéotropique. Après 13.5h de contact, le milieu est refroidi et repris par une solution saturée de NaHCO₃. La phase organique est séparée et lavée par une solution saturée de NaCl. Après séchage sur MgSO₄, le milieu est concentré pour donner un brut de 672g.

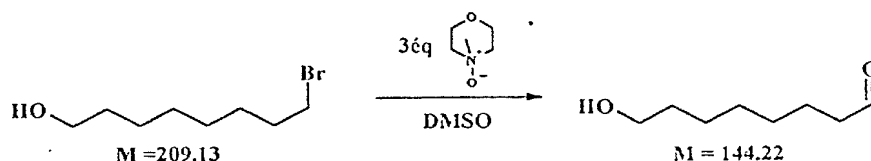
Le 8-bromooctanol est purifié par distillation
20 sous pression réduite, à 96°C sous P<1mbar, m=575g (92%).

Caractérisation :

- CCM : $R_f = 0,8$ (heptane/éther iso 8/2)

25 - RMN ^1H (200Mhz, CDCl_3) : 3.65 (t, 2H, $J=6.4\text{Hz}$) ; 3.43 (t, 2H, $J=6.8\text{Hz}$) ; 1.87 (m, 2H) ; 1.36-1.69 (m, 10H).

2. Etape d'oxydation en aldéhyde.



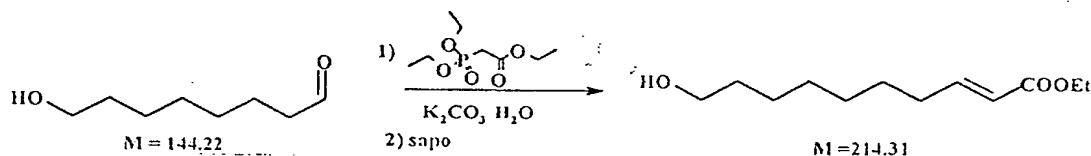
708 g (5.87, 3éq) de N-Oxyde de N-Methylmorpholine anhydre sont mis en solution, sous N₂, dans 3l de DMSO. 410g (1,96 mol) de 8-bromooctanol dissous dans 1l de DMSO sont ensuite additionnés en 30min. Le milieu devient limpide. Le bromure d'ammonium de la N-Methylmorpholine précipite. Après 65h d'agitation à température ambiante, ce sel est filtré et le milieu est repris par 4 l d'une solution saturée de NaCl. Après extraction par 4 x 1l d'acétate d'éthyle et séchage, 320 g de brut, constitués à 74% d'aldéhyde (R=83%) et 26% de 1.8-octanediol.

Caractérisation :

- CCM : R_f = 0,6 (heptane/acétate d'éthyle 8/2)

- RMN ¹H (400Mhz, CDCl₃) : 9.74 (t, 1H, J=1.7Hz) ; 3.61 (t, 2H, J=6.6Hz) ; 2.41 (dt, 2H, J=1.7 et 7.3Hz) ; 1.51-1.65 (m, 4H) ; 1.24 -1.37 (m, 6H).

3. Etape 3 : Réaction de Wittig-Horner.



Le brut précédent (320g) est placé en solution dans 3l d'eau. 800ml (4.2mol, 2.1éq) de triéthylphosphonoacétate sont ensuite ajoutés suivis de 830g (6mol) de carbonate de potassium. Après 20h d'agitation, la réaction est terminée. Le milieu est extrait par 4 x 1l d'éther isopropylique. Après séchage sur MgSO₄, les phases organiques sont évaporées pour conduire à 650g de brut.

Le produit est purifié soit par distillation E=120°C sous P<1mbar.

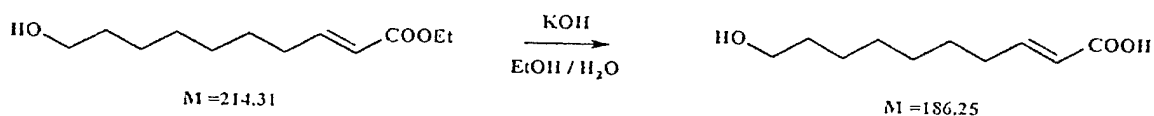
Dans ce cas, on récupère 280g d'un liquide incolore conforme par RMN (R=80% à partir de l'aldéhyde ou 66% à partir du dérivé bromé) soit par chromatographie avec une élution heptane/acétate d'éthyle 8/2 dans ce cas 119.6g de produits sont obtenus (28% à partir du dérivé bromé).

Caractérisation :

- CCM : Rf = 0,8 (heptane/acétate d'éthyle 8/2)

- RMN ^1H (400Mhz, CDCl_3) : 6.91-6.99 (m, 1H) ; 5.78-5.82 (dt, 1H, $J=1.4$ et 15.6Hz) ; 4.17 (q, 2H, $J=7.1\text{Hz}$) ; 3.63 (t, 2H, $J=6.6\text{Hz}$) ; 2.18 (dq, 2H, $J=1.2$ et 7.3Hz) ; 1.22 -1.65 (m, 11H).

4. Etape 4 : Réaction de saponification.



119.6g (0.56mol) d'hydroxyester est dissous dans 600ml d'éthanol et 400ml d'une solution 4.6N de KOH sont additionnés. Le milieu est agité 8h. Le milieu est extrait par de l'éther isopropylique. La phase aqueuse est acidifiée à pH=1 et extraite à l'acétate d'éthyle. Après séchage et évaporation, 99.6g de solide rose sont obtenus. Recristallisé dans un mélange éther isopropylique / éther de pétrole, le produit est obtenu sous forme d'un solide blanc (86g, 83%).

Caractérisation :

CCM : Rf = 0,2 (heptane/acétate d'éthyle 7/3)

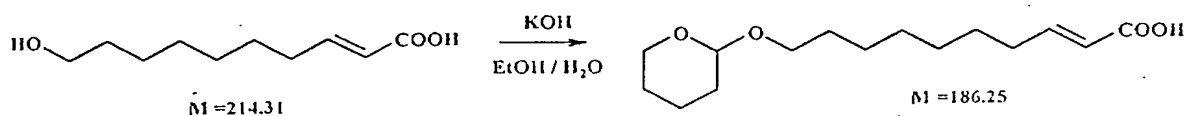
Point de fusion : F=61.3°C

RMN ^1H (400Mhz, CDCl_3) : 7.06 (dt, 1H, $J=15.6$ et 7Hz) ; 5.81 (dt, 1H, $J=1.5$ et 15.6Hz) ; 3.64 (t, 2H,

$J=6.6\text{Hz}$) ; 2.22 (dq, 2H, $J=1.2$ et 7.3Hz) ; 1.52-1.58 (m, 2H) ; 1.45 -1.48 (m, 2H) ; 1.33 -1.3765 (m, 6H).

5. Etape 5 : Réaction de protection.

5



86g (0.46mol) d'hydroxyacide sont placés en solution avec 45ml (0.48mol) de 3,4-dihydro-2H-pyranne dans 500ml de THF. 1ml d'HCl concentré est ajouté et le milieu est agité 24h.

10

Le THF est ensuite concentré, le brut est repris dans de l'acétate d'éthyle et lavé avec une solution de NaCl saturée jusqu'à pH neutre. Après séchage sur MgSO₄, 132g de produit brut sont obtenus (>100%) .

15

Caractérisation :

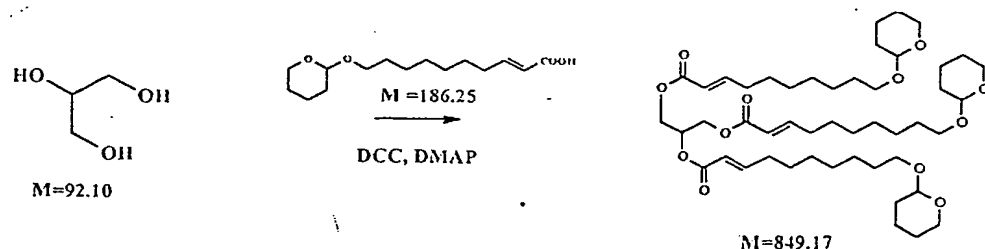
CCM : R_f = 0,4 (heptane/acétate d'éthyle 7/3) .

RMN ¹H (400Mhz, CDCl₃) : 7.06 (dt, 1H, $J=15.6$ et 7Hz) ; 5.81 (dd, 1H, $J=1.6$ et 15.6Hz) ; 4.58 (t, 1H, $J=2.8\text{Hz}$) ; 3.82-3.91 (m, 1H) ; 3.71-3.73 (m, 1H) ; 3.51 - 3.52 (m, 1H) ; 3.36 -3.39 (m, 1H) ; 2.20 (m, 2H) ; 1.33 - 1.89 (m, 16H).

20

6. Etape 6 : réaction d'estérification du glycérol.

25



8.4g (0.091mol) de glycérol sont placés en solution dans 500ml de dichlorométhane. Le brut précédent

(0.46mol), après élimination des traces d'eau par distillation azéotropique, est dissous dans 500ml de dichlorométhane et ajouté au milieu. 56.8g (0.46mol) de diméthylaminopyridine sont ensuite ajoutés suivis de 97g (0.46mol) de dicyclohexylcarbodiimide. Le milieu est agité 78h. Un précipité apparaît qui est filtré.

Le milieu est concentré et repris dans de l'éther isopropylique. Après filtration et concentration, 156g de brut sont obtenus et purifiés par chromatographie et avec une élution heptane/acétate d'éthyle 7/3.

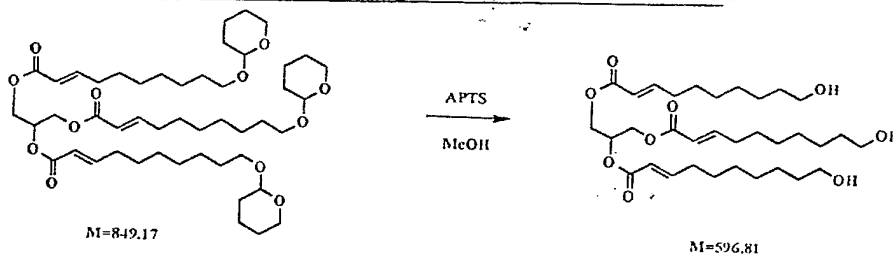
99g d'une fraction contenant 2/3 de produit et 1/3 d'acylurée sont obtenus.

Caractérisation :

CCM : Rf = 0.7 (heptane/acétate d'éthyle 7/3)

RMN ^1H (400Mhz, CDCl_3) : 6.96 (m, 3H) ; 5.80 (dd, 3H, $J=1.6$ et 15.6Hz) ; 5.29-5.31 (m, 1H) ; 4.54-4.57 (m, 3H) ; 4.20-4.39 (m, 4H) ; 3.81-3.89 (m, 3H) ; 3.68 - 3.72 (m, 3H) ; 3.41-3.49 (m, 3H) ; 3.34-3.39 (m, 3H) ; 2.25-2.18 (m, 6H) ; 1.33 -1.99 (m, 48H).

7. Etape 7 : Déprotection finale.



99g (0.136mol) du mélange précédent est solubilisé dans 1l de méthanol avec 9.9g d'APTS. Le milieu est agité 14h. La réaction est terminée, le milieu est alors concentré. L'huile obtenue est alors reprise dans H_2O et amenée à pH=6 avec une solution saturée de NaHCO_3 . La phase aqueuse est extraite avec du dichlorométhane. Après séchage de la phase organique et évaporation, 77g d'une huile jaune sont obtenus.

Le produit est purifié par chromatographie sur silice CH_2Cl_2 /acétone 9/1 à 1/1 et CH_2Cl_2 /méthanol 95/5.

27 g de produit sont obtenus sous forme d'une huile qui cristallise sous forme d'un solide blanc jaune amorphe de pureté entre 85-90%.

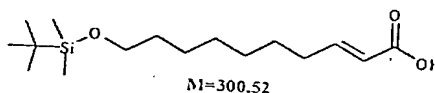
Caractérisation :

CCM : $R_f = 0.2$ (CH_2Cl_2 /acétone 9/1)

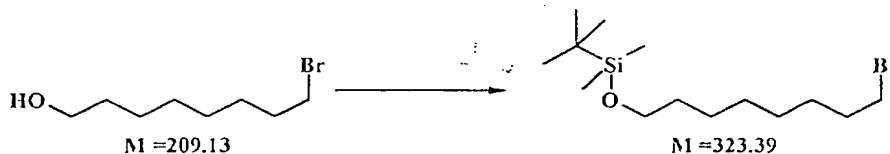
RMN ^1H (400Mhz, CDCl_3) : 6.94-7.01 (m, 3H) ; 5.78-5.84 (m, 3H) ; 5.29-5.31 (m, 1H) ; 4.20-4.34 (m, 4H) ; 3.60 -3.65 (m, 6H) ; 2.16 -2.22 (m, 6H) ; 1.33 -1.99 (m, 30H).

Exemple 2 : Mode opératoire pour la synthèse

de:



1. Etape 1 : Protection du 8-bromooctanol.



21 g (0,1 mol) de 8-bromooctanol sont dissous dans 200ml de dichlorométhane. 16 g (0,104 mol) de chlorure de terbutyldiméthylsilyle sont ensuite ajouté à 0°C, suivis de 7,5 g (0,11 mol) d'imidazole. Un précipité se forme instantanément. Après 3h d'agitation, le milieu est filtré, concentré et le brut est distillé.

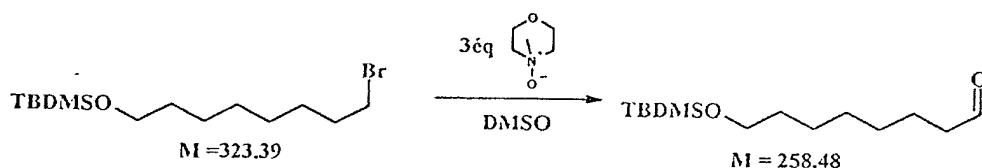
25,8 g de produit sont ainsi isolés à 99-104°C sous P <1 mbar (82%).

Caractérisation :

RMN ^1H (400Mhz, CDCl_3) : 3.59 (t, 2H, $J= 6.6\text{Hz}$) ; 3.39 (t, 2H, $J= 6.9\text{Hz}$) ; 1.82-1.89 (m, 2H) ; 1.30-1.50 (m, 10H) ; 0.88 (t, 9H, $J= 2.7\text{Hz}$) ; 0.04 (s, 6H).

5

2. Etape 2 : Oxydation en aldéhyde.



10

20 g (61 mmol) de dérivé silylé sont mis en solution dans 200ml de DMSO. 21,7 g (0,18 mol) de *N*-oxyde de *N*-methylmorpholine sont ensuite ajoutés. Le milieu est agité 72h. Un précipité apparaît. Le milieu est dilué avec NaCl saturé puis extrait avec de l'éther isopropylique. Après séchage et évaporation, 15,3 g de brut sont obtenus.

15

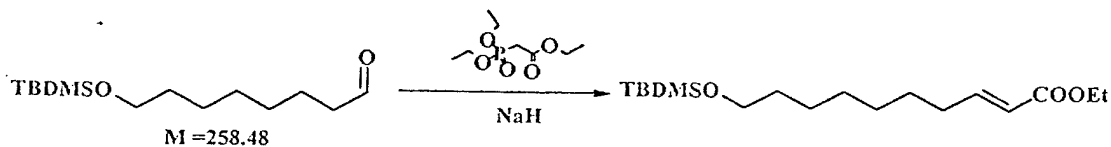
Le produit est purifié par distillation à 81°C sous $P<1\text{mbar}$ (9g, 57%).

Caractérisation :

20

RMN ^1H (400Mhz, CDCl_3) : 9.76 (t, 1H, $J= 1.9\text{Hz}$) ; 3.59 (t, 2H, $J= 6.6\text{Hz}$) ; 2.42 (dt, 2H, $J= 1.8$ et 7.2Hz) ; 1.49-1.68 (m, 4H) ; 1.30-1.32 (m, 6H) ; 0.88 (t, 9H, $J= 2.7\text{Hz}$) ; 0.04 (t, 6H, $J= 2.9\text{Hz}$).

3. Etape 3 : Réaction de Wittig.



25

835 mg (21 mmol) de NaH sont mis en solution avec 5 ml de THF et refroidis à $T<0^\circ\text{C}$. 4,2 ml (22 mmol) de triéthylphosphonoacétate sont ajoutés goutte à goutte. Après 3h d'agitation à température ambiante, 5 g (19 mmol)

5 3,7 g de produits sont obtenus par purification
sur gel de silice (élution heptane/acétate d'éthyle 8/2)
(60%).

10 CCM : Rf= 0.6 (heptane /acétate d'éthyle 8/2)

RMN ^1H (400Mhz, CDCl_3) : 6.95 (dt, 1H, $J= 8.6$ et 15.6Hz) ; 5.79 (dt, 1H, $J= 1.4$ et 15.6Hz) ; 4.17 (q, 2H, $J= 7.1\text{Hz}$) ; 3.58 (dt, 2H, $J= 6.6$ et 9.8Hz) ; 2.15-2.21 (m, 2H) ; 1.46 -1.51 (m, 4H) ; 1.24 -1.42 (m, 9H) ; 0.88 (t, 9H, $J= 2.7\text{Hz}$) ; 0.04 (t, 6H, $J= 2.9\text{Hz}$).

$$\text{TBDMSO}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-\text{COOEt} \xrightarrow[\text{EtOH} / \text{H}_2\text{O}]{\text{KOH}} \text{TBDMSO}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$$

20 2 g (6 mmol) d'ester sont dissous dans 10 ml d'éthanol et 5 ml d'une solution de NaOH 3,8 N sont ajoutés. La réaction est terminée en 4h. Le milieu est acidifié à pH=1 et extrait à l'acétate d'éthyle. Le produit est ainsi obtenu sans autre purification (1,5 g, 83%).

25

Caractérisation :
CCM : 0.2 (heptane/acétate d'éthyle 7/3)

RMN ^1H (400Mhz, CDCl_3) : 7.07 (dt, 1H, $J= 8.6$ et 15.6Hz) ; 5.81 (dt, 1H, $J= 1.4$ et 15.6Hz) ; 3.59 (dt, 2H, $J= 6.6$ et 9.8Hz) ; 2.21 -2.27 (m, 2H) ; 1.46 -1.51 (m, 4H) ; 1.24 -1.42 (m, 6H) ; 0.89 (t, 9H, $J= 2.7\text{Hz}$) ; 0.04 (t, 6H, $J= 2.9\text{Hz}$).

Exemple 3 : Evaluation de l'activité anti-collagénase de produits obtenus par le procédé de l'invention sur coupes congelées de peau humaine.

5

1. Mode opératoire.

10

Cette étude est réalisée sur différentes solutions à la concentration de 1 % et 2 % de principes actifs en comparaison avec l'excipient seul, les témoins tampon et collagénase. Les principes actifs utilisés sont le DHA, le 2-diméthylamino éthyl ester de l'acide 10-hydroxy-trans décénoïque (ML40) et le glycérol ester de l'acide 10-hydroxy-trans décénoïque (GM). Le tableau 1 résume les différentes solutions testées.

15

Tableau 1

| Solution | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
|-----------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| DHA | 2% | | | 1% | | | 2% | | | 1% | | | |
| ML40 | | 2% | | | 1% | | | 2% | | | 1% | | |
| GM | | | 2% | | | 1% | | | 2% | | | 1% | |
| Collagénase (U/ml) | | | | | | | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 |

20

Des coupes congelées de 5 μ m, provenant d'une plastie mammaire d'une femme de 54 ans, sont placées sur des lames histologiques (4 coupes par lame). Chaque solution est testée sur une lame.

25

Les coupes sont recouvertes des solutions à tester puis mises à incuber pendant 2 heures à 37°C en chambre humide. Les solutions sont éliminées par rinçages répétitifs et les coupes sont colorées au picrosirius. L'examen microscopique est réalisé à l'objectif de 2,5 et les photographies papier sont prises avec un film Kodak Gold 100 ASA.

30

Exemple 3 : Evaluation de l'activité anti-collagénase de produits obtenus par le procédé de l'invention sur coupes congelées de peau humaine.

1. Mode opératoire.

Cette étude est réalisée sur différentes solutions à la concentration de 1 % et 2 % de principes actifs en comparaison avec l'excipient seul, les témoins tampon et collagénase. Les principes actifs utilisés sont le DHA, le 2-diméthylamino éthyl ester de l'acide hydroxy-10-décène-2(trans)oïque (ML40) et le glycérol ester de l'acide hydroxy-10-décène-2(trans)oïque (GM). Le tableau 1 résume les différentes solutions testées.

Tableau 1

| Solution | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
|-----------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| DHA | 2% | | | 1% | | | 2% | | | 1% | | | |
| ML40 | | 2% | | | 1% | | | 2% | | | 1% | | |
| GM | | | 2% | | | 1% | | | 2% | | | 1% | |
| Collagénase (U/ml) | | | | | | | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 |

Des coupes congelées de 5 μ m, provenant d'une plastie mammaire d'une femme de 54 ans, sont placées sur des lames histologiques (4 coupes par lame). Chaque solution est testée sur une lame.

Les coupes sont recouvertes des solutions à tester puis mises à incuber pendant 2 heures à 37°C en chambre humide. Les solutions sont éliminées par rinçages répétitifs et les coupes sont colorées au picrosirius. L'examen microscopique est réalisé à l'objectif de 2,5 et les photographies papier sont prises avec un film Kodak Gold 100 ASA.

2. Résultats.

Le tableau 2 résume les résultats de l'altération de la structure collagénique en fonction de la solution testée. Une absence d'altération de la structure collagénique est indiquée par 0 alors qu'une structure collagénique moyennement ou nettement à très fortement altérée est indiquée respectivement par 1 ou 2.

Tableau 2

| Solution | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
|--|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| DHA | 2% | | | 1% | | | 2% | | | 1% | | | |
| ML40 | | 2% | | | 1% | | | 2% | | | 1% | | |
| GM | | | 2% | | | 1% | | | 2% | | | 1% | |
| Collagénase (U/ml) | | | | | | | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 |
| Altération de la structure collagénique | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 2 | 2 | 2 |

De plus, l'application du témoin tampon Tris ou de l'excipient n'induit aucune altération de la structure collagénique.

Par conséquent, le produit DHA à 1 et à 2 % inhibe totalement l'activité de la collagénase, alors que les produits ML40 et GM à 2% inhibe légèrement l'activité de la collagénase.

Exemple 4 : Evaluation de l'activité anti-collagénase du GM obtenu par le procédé de l'invention sur explants de peau humaine maintenue en survie.

1. Mode opératoire.

L'étude est faite sur un produit à 5% de GM en comparaison avec de l'excipient (hydrocérine), un contrôle positif et un témoin en présence de la collagénase à 100 U/ml.

L'hydrocérine est utilisé comme excipient pour la préparation du produit à appliquer. Cette étude a été réalisée deux fois. Dans la première étude, il a été constaté que l'action de la collagénase à J2 reste très limitée et non significative. Dans la deuxième étude, le temps d'application est prolongé et le prélèvement des explants est effectué à J2 et à J4.

a. Préparation des explants.

Des explants de peau humaine préparés et répartis en 16 lots de trois explants chacun sont mis en survie selon le tableau 3.

Tableau 3

| | J2 | J4 |
|--------------------------------|------------|------------|
| Témoin | 3 explants | 3 explants |
| Excipient | 3 explants | 3 explants |
| Produit à 5% GM | 3 explants | 3 explants |
| Contrôle positif | 3 explants | 3 explants |
| Témoin + collagénase | 3 explants | 3 explants |
| Excipient + collagénase | 3 explants | 3 explants |
| Produit à 5% GM + collagénase | 3 explants | 3 explants |
| Contrôle positif + collagénase | 3 explants | 3 explants |

b. Application du produit à 5% de GM.

Le produit est appliqué à J0 et à J2 à raison de 20 mg par explant et la collagénase est incorporée dans les milieux de culture des 24 derniers lots.

c. Histologie.

Trois explants de chaque lot sont prélevés à J2 et à J4 fixés au Bouin ordinaire et traités en histologie.

L'étude histologique comprend :

- imprégnation en paraffine,
- coupes,

- coloration au rouge sirius F3B
- mesures colorimétriques du collagène par analyse d'images
- rapport avec photos.

5

2. Résultats.

Les prélèvements réalisés à J2 ne montre aucune activité significative de la collagénase quelque soit le lot examiné. Pour cette raison, la survie, le contact et l'application sont prolongés jusqu'à J4. L'action de la collagénase est notée de 2 manières : intensité de la coloration du réseau de collagène et épaisseur de la structure dermique. Avec cette étude, sont corrolées la pénétration du principe actif et son activité inhibitrice vis-à-vis de la collagénase. Les résultats obtenus sont les suivants :

20

- pour les témoins sans collagénase, le derme présente une structure normale, avec des faisceaux de collagène réguliers dans tous les compartiments,

- pour les témoins avec collagénase, les faisceaux de collagène sont très fortement dégradés et l'épaisseur du derme a diminué de moitié,

25

- pour les explants avec excipient et collagénase, les faisceaux de collagène sont fortement dégradés, l'altération étant inférieure à celle observée sur les témoins avec collagénase, et l'épaisseur du derme a diminué de presque moitié,

30

- pour les explants avec produit à 5% de GM et collagénase, les faisceaux de collagène sont très légèrement dégradés et l'épaisseur du derme a légèrement diminuée,

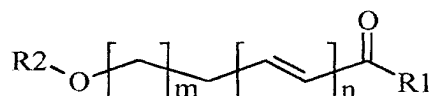
- pour les explants avec contrôle positif (phénanthroline) et collagénase, la structure dermique est identique à celle des témoins sans collagénase.

Dans ces conditions expérimentales, le produit GM montre une nette activité anti-collagénase.

REVENDICATIONS

- 5 1) Procédé de préparation des hydroxy-acides gras insaturés et de leurs esters répondant à la formule générale suivante (Id) :

Formule (Id)



10

avec $n = 1$ à 4

$m = 2$ à 16

15 $R_1 = OH, Cl, Br, OR_3$ où R_3 représente un radical alkyl, alkényl, alkynyl, linéaire ou ramifié de 1 à 16 carbones ou esters du glycérol, éventuellement substitué par un ou plusieurs atomes de carbone, d'azote, de soufre ou d'halogènes tels que fluor, chlore, brome et iode,

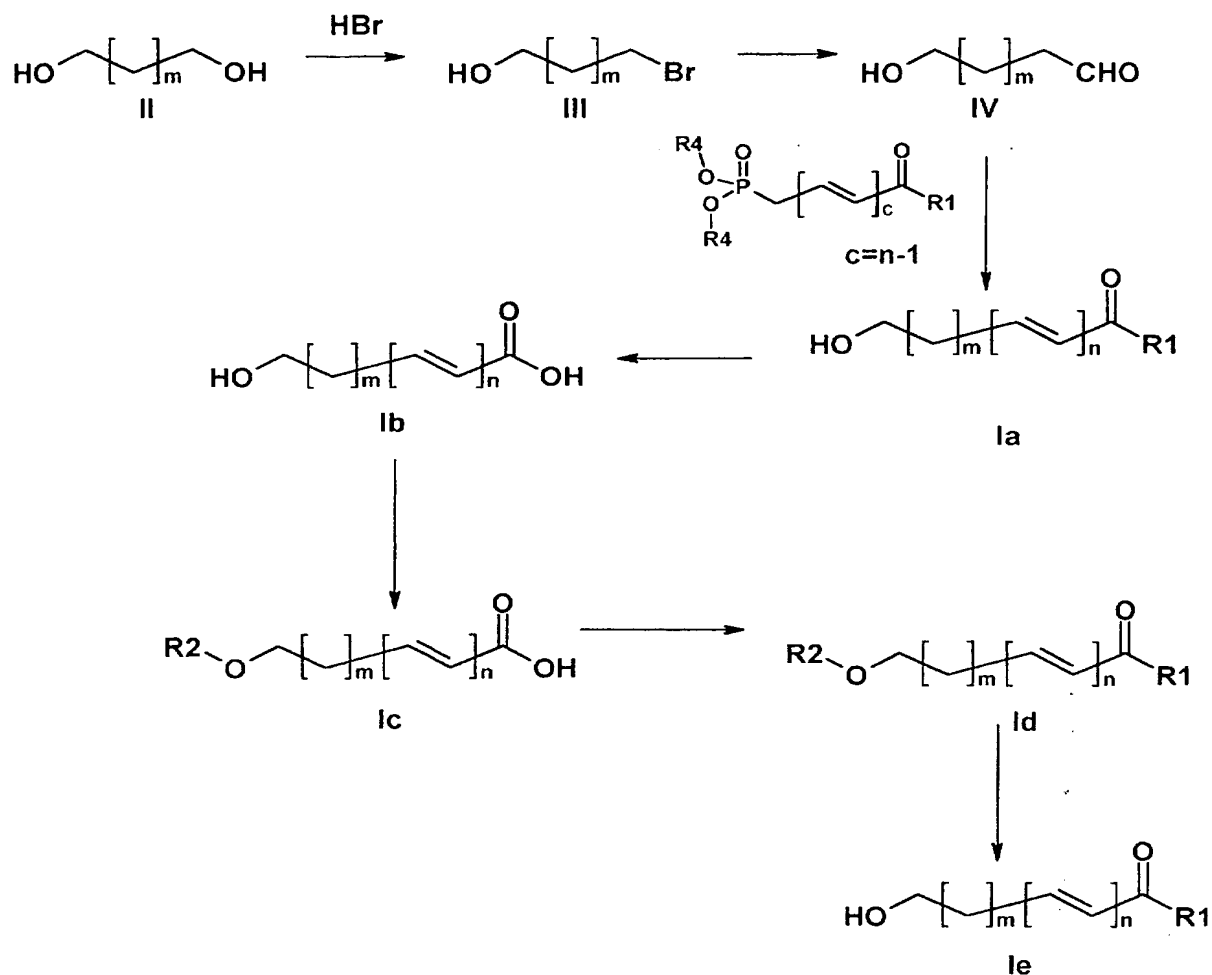
20 $R_2 = H, SiR'_1R'_2R'_3$ où R'_1, R'_2, R'_3 identiques ou différents les uns des autres, représentent un radical alkyl, alkényl, alkynyl, linéaire ou ramifié de 1 à 16 carbones ou esters du glycérol, éventuellement substitué par un ou plusieurs atomes de carbone, d'azote, de soufre ou d'halogènes tels que fluor, chlore, brome et iode,

25 ou $R_2 = C-Ar_3$ avec Ar représentant un radical aryl éventuellement substitué par un ou plusieurs atomes de carbone, d'azote, de soufre ou d'halogènes tels que fluor, chlore, brome et iode,

ou $R_2 =$ le tétrahydropyranyl de formule :



caractérisé en ce que le schéma réactionnel est le suivant :



5 où R_1 , R_2 , m et n ont la même signification que dans la formule Id.

2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la première étape est une bromation, le composé de départ étant un diol de formule (II).

3) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que la première étape nécessite l'utilisation d'un solvant.

4) Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le solvant est choisi parmi le

toluène, le benzène, le diméthylformamide, le tétrahydrofuran, le cyclohexane, l'heptane, l'éther de pétrole.

5 5) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le réactif utilisé dans la première étape est choisi parmi le HBr aqueux ou non, le $\text{Ph}_3\text{P}, \text{Br}_2$, le tétrabromide de carbone triphénylphosphine et l'acide hydrobromique.

10 6) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la seconde étape est une oxydation en aldéhyde de formule (IV) en présence d'un N-oxyde d'amine tertiaire cyclique ou non
15 cyclique, anhydre ou non anhydre et en présence de DMSO.

20 7) Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que le N-oxyde d'amine tertiaire cyclique ou non cyclique, anhydre ou non anhydre est choisi parmi le
N méthyl morpholine oxyde, le triméthylamine oxyde ou le triéthylamine oxyde ou un mélange de ceux-ci.

25 8) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'étape 3 dudit procédé est une réaction de Witting-Horner et que
l'étape 4 dudit procédé est une réaction de saponification.

30 9) Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que ladite réaction de Witting-Horner est réalisée en présence de triéthylphosphonoacétate et de carbonate de potassium.

35 10) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'étape 5 dudit procédé est une étape de protection spécifique de la

fonction alcool du composé de formule générale (Ib) obtenu à l'étape 4.

5 11) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'étape 5 s'effectue dans tout éther d'énol en présence d'un catalyseur acide.

10 12) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'étape 5 s'effectue dans le dihydropyrane en présence d'APTS (Acide para toluène sulfonique).

15 13) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le produit de formule (Id) obtenu à l'étape 5 du procédé de l'invention subit une déprotection finale afin d'obtenir le composé de formule générale (Ie).

20 14) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que le produit de formule (Id) obtenu à l'étape 5 dudit procédé est utilisé dans une réaction d'estérification du glycérol avant de subir une déprotection finale.

25 15) Procédé selon l'une des revendications revendication 13 ou 14, caractérisé en ce que ladite déprotection est réalisée dans une solution de méthanol contenant un catalyseur acide.

30 16) Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce le catalyseur acide utilisé est l'ATPS.

35 17) Utilisation d'un produit susceptible d'être obtenu par un procédé selon l'une quelconque des

revendications précédentes, comme agent actif anti-collagénase.

5 18) Utilisation de l'acide 10-hydroxy-trans
décénoïque (DHA) ou du glycérol ester de l'acide 10-
hydroxy-trans décénoïque comme agent actif anti-collagénase
dans une préparation médicamenteuse et/ou cosmétique.

10 19) Utilisation selon la revendication 18, pour
la préparation d'un médicament destiné à prévenir ou à
guérir la dégradation du collagène.

15 20) Utilisation selon la revendication 19, pour
la préparation d'un médicament destiné à prévenir ou à
guérir la dégradation du collagène par les collagénases
bactériennes lors d'une infection bactérienne.

20 21) Utilisation selon la revendication 18, pour
la préparation d'un médicament destiné à la régénérescence
de la peau et des ligaments.

25 22) Utilisation selon la revendication 18, pour
préparation d'un médicament destiné à prévenir ou à guérir
l'invasion tumorale.

30 23) Utilisation selon la revendication 18, pour
la préparation d'un médicament destiné à prévenir ou à
guérir des maladies dégénératives présentant une
dégénérescence fibrinoïde du collagène et également
appelées « maladies du collagène ».

revendications précédentes, comme agent actif anti-collagénase dans une préparation médicamenteuse et/ou cosmétique.

5 18) Utilisation selon la revendication 17, caractérisé en ce que ledit produit est l'acide 10-hydroxy-trans décénoïque (DHA) ou le glycérol ester de l'acide 10-hydroxy-trans décénoïque.

10 19) Utilisation selon la revendication 18, pour la préparation d'un médicament destiné à prévenir ou à guérir la dégradation du collagène.

15 20) Utilisation selon la revendication 19, pour la préparation d'un médicament destiné à prévenir ou à guérir la dégradation du collagène par les collagénases bactériennes lors d'une infection bactérienne.

20 21) Utilisation selon la revendication 18, pour la préparation d'un médicament destiné à la régénérescence de la peau et des ligaments.

25 22) Utilisation selon la revendication 18, pour la préparation d'un médicament destiné à prévenir ou à guérir l'invasion tumorale.

30 23) Utilisation selon la revendication 18, pour la préparation d'un médicament destiné à prévenir ou à guérir des maladies dégénératives présentant une dégénérescence fibrinoïde du collagène et également appelées « maladies du collagène ».

revendications précédentes, comme agent actif anti-collagénase dans une préparation médicamenteuse et/ou cosmétique.

5 18) Utilisation selon la revendication 17, caractérisé en ce que ledit produit est l'acide hydroxy-10-décène-2(trans)oïque (DHA) ou du glycérol ester de l'acide hydroxy-10-décène-2(trans)oïque.

10 19) Utilisation selon la revendication 18, pour la préparation d'un médicament destiné à prévenir ou à guérir la dégradation du collagène.

15 20) Utilisation selon la revendication 19, pour la préparation d'un médicament destiné à prévenir ou à guérir la dégradation du collagène par les collagénases bactériennes lors d'une infection bactérienne.

20 21) Utilisation selon la revendication 18, pour la préparation d'un médicament destiné à la régénérescence de la peau et des ligaments.

25 22) Utilisation selon la revendication 18, pour la préparation d'un médicament destiné à prévenir ou à guérir l'invasion tumorale.

30 23) Utilisation selon la revendication 18, pour la préparation d'un médicament destiné à prévenir ou à guérir des maladies dégénératives présentant une dégénérescence fibrinoïde du collagène et également appelées « maladies du collagène ».

**BREVET D'INVENTION****CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11 235*02

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.. / 1..

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

| | | | |
|--|----------------------|-----------------------|----------------------|
| Vos références pour ce dossier (facultatif) | | 13050FR | |
| N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL | | 0111815 | |
| TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) PROCÉDE DE PREPARATION DES HYDROXY-ACIDES GRAS INSATURES ET DE LEURS ESTERS, LEUR UTILISATION COMME AGENT ANTI-COLLAGENASE | | | |
| LE(S) DEMANDEUR(S) : POTIER Pierre 14 avenue de Breteuil F-75007 PARIS FRANCE | | | |
| DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages). | | | |
| Nom | | POTIER | |
| Prénoms | | Pierre | |
| Adresse | Rue | 14 avenue de Breteuil | |
| | Code postal et ville | 75007 | PARIS |
| Société d'appartenance (facultatif) | | | |
| Nom | | PICOT | |
| Prénoms | | Françoise | |
| Adresse | Rue | 50 rue de Dampierre | |
| | Code postal et ville | 78460 | CHEVREUSE |
| Société d'appartenance (facultatif) | | | |
| Nom | | BRAYER | |
| Prénoms | | Jean-Louis | |
| Adresse | Rue | 42 rue Jules Dubrulle | |
| | Code postal et ville | 60440 | NANTEUIL LE HAUDOUIN |
| Société d'appartenance (facultatif) | | | |
| DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) le, 11 Septembre 2002 BREESE Pierre 921038 | | | |

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)